

Standard Operating Procedure

ESTUDIO CLINICO CONTROLADA SOBRE EL EFECTO DE LA DIETA MEDITERRANEA, RICA EN ACEITE DE OLIVA, EN LA REDUCCION DEL RIESGO CORONARIO DE PACIEBNTES CON CARDIOPATÍA ISQUÉMICA

Coordinadores para el desarrollo del Proyecto:

Francisco Pérez Jiménez: *Catedrático y Jefe de Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario Reina Sofía.*

José Suárez de Lezo Cruz Conde: *Profesor Titular y Jefe de Servicio de Cardiología. Hospital Universitario Reina Sofía.*

José López Miranda: *Profesor Titular y Jefe de Sección de Medicina Interna. Hospital Universitario Reina Sofía. Diplomado en Epidemiología e Investigación clínica por la Escuela Andaluza de Salud Pública.*

Fernando López Segura: *Médico especialista de Medicina Interna. Hospital Universitario Reina Sofía.*

Tabla de Contenidos

1. Reclutamiento

1.1 Población

1.2 Criterios de inclusión/exclusión

1.3 Procedimientos de reclutamiento

1.4 Estudios basales

1.5 Recogida de datos

1.6 Asignación del código del estudio

1.7 Procedimiento de Aleatorización

2. Intervención dietética

3. Seguimiento de la Población

4. Plan general de trabajo

5. Evaluación nutricional. Plan de intervención dietética

6. Procesamiento, almacenamiento y etiquetado de muestras

1. RECLUTAMIENTO

1.1 Población

874 pacientes diagnosticados de enfermedad coronaria de alto riesgo (infarto agudo de miocardio, angor inestable y cardiopatía isquémica crónica de alto riesgo) serán randomizados para recibir una de las dos dietas (437 pacientes por grupo).

1.2 Criterios Inclusión/Exclusión

Los enfermos se seleccionarán cuando acudan al Hospital para ser atendidos por un episodio incluíble en los criterios diagnósticos seguidamente propuestos.

I.- CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

1.- Consentimiento informado: Todos los participantes aceptarán su inclusión en el estudio, firmando el protocolo aprobado por el Comité Etico de Investigación Clínica del Hospital Universitario Reina Sofía. En dicho consentimiento se hará constar que su inclusión en los grupos tendrá carácter aleatorio.

2.- Criterios diagnósticos:

Se seleccionarán pacientes con enfermedad coronaria aguda (angina inestable, infarto agudo de miocardio) y enfermedad coronaria crónica de algo riesgo, de acuerdo a los siguientes criterios:

a) Infarto agudo de miocardio: Existencia de, al menos, dos de las tres manifestaciones siguientes: dolor torácico de características anginosas (o equivalentes anginosos), cambios típicos del electrocardiograma (aparición de nuevas ondas Q y/o cambios del segmento ST y/o onda T), y elevación de las enzimas miocárdicas (CPK y/o CPK/MB > 2 veces el límite superior normal del laboratorio. El criterio del valor de la MB prevalecerá, en caso de discrepancias, sobre el de la CPK total.

b) Angina inestable (74)

Ingreso hospitalario por dolor torácico de características anginosas de al menos 15 minutos de duración, tanto en reposo como tras el esfuerzo, que se haya incrementado en frecuencia y duración en los últimos días o semanas. El último episodio debe haber ocurrido en las 48 horas previas al ingreso y debe acompañarse de, al menos, una de las siguientes alteraciones electrocardiográficas o analíticas:

- Descenso del ST de, al menos, 0,5 mm en 2 derivaciones contiguas.
- Ascenso del ST de, al menos, 1 mm en 2 derivaciones contiguas.
- Inversión de la onda T de, al menos, 2 mm en 2 derivaciones contiguas
- Troponina positiva.

c) Cardiopatía isquémica crónica de alto riesgo.

Se incluirán aquellos pacientes que hayan estado ingresados por un evento coronario y/o angina estable, al menos una vez en los 2 años precedentes y que hayan sido sometidos a una coronariografía diagnóstica con evidencia de enfermedad coronaria severa, definida como la existencia de un vaso epicárdico mayor de 2.5 mm de diámetro con estenosis superior al 50%.

II- CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

1.- Edad inferior a 20 años o igual o mayor de 75 años, con una expectativa de vida que no sea inferior a 5 años.

2.- Insuficiencia cardíaca severa, clase funcional III o IV de la NYHA, con la excepción de episodios autolimitados de insuficiencia cardíaca aguda en el momento del evento isquémico agudo.

3.- Disfunción ventricular izquierda sistólica severa (Con fracción de eyección igual o inferior a 35%).

4.- Pacientes con limitación para seguir el protocolo: Se excluirán las personas sin capacidad personal o familiar de adscribirse a la dieta indicada, por cualquier causa.

5.- Factores de riesgo graves o de difícil control: Se excluirán los enfermos con hipertensión y diabetes en los que haya afectación orgánica que limite su supervivencia (insuficiencia renal crónica con creatinina persistentemente >2.5 mg/dl) y manifestaciones clínicas incapacitantes de arteriosclerosis cerebral.

6.- Enfermedades crónicas no relacionadas con el riesgo coronario: Enfermedades psiquiátricas severas, procesos crónicos necesitados de tratamiento que pueda modificar el metabolismo lipídico (insuficiencia renal crónica, hepatopatías crónicas, neoplasias en tratamiento, enfermedad pulmonar obstructiva crónica con insuficiencia respiratoria pulmonar con oxigenoterapia domiciliaria, endocrinopatías susceptibles de descompensación y enfermedades del tubo digestivo que cursen con episodios de diarrea).

7.- Participantes en otros estudios: Se excluirán a los pacientes participantes en otros estudios, en el momento de la selección o en los 30 días previos al comienzo del estudio.

1.3 Procedimientos de reclutamiento

- Los pacientes serán derivados desde el Servicio de Cardiología del hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba.
- El cardiólogo que atienda al enfermo le sugerirá su participación en el estudio, una vez comprobado que cumple los criterios de inclusión y que no posee los de exclusión. Si el paciente decide colaborar, uno de los médicos internistas le abrirá el correspondiente cuaderno de recogida de datos (CRD), que será valorado seguidamente por el coordinador y por los cardiólogos externos independientes. Si la información de éstos es favorable se le solicitará al paciente el consentimiento informado. A todos los pacientes se les pedirá que entreguen el consentimiento informado por escrito antes de realizar cualquier procedimiento del estudio (incluidas las extracciones de sangre). A todos los pacientes se les entregará una copia de su consentimiento informado.
- Cada paciente rellenará el cuestionario de Screening inicial así como el de Salud y Estilos de Vida.

- Seguidamente se le realizarán los estudios basales (comentados en el siguiente apartado) y será aleatorizado y asignado a una de las dos dietas del estudio.

1.4 Estudios basales

A todos los individuos se les cumplimentará un CRD que incluirá la historia clínica y las determinaciones complementarias oportunas, con el objeto de definir la presencia de factores de riesgo y la existencia de criterios de inclusión y exclusión. Dicho estudio será realizado por el médico responsable de su atención general (especialista en medicina interna) y por el especialista en cardiología que se ocupará de su seguimiento. En dicho estudio se incluirán los siguientes parámetros:

a.- Clínicos

1.- Antecedentes familiares de enfermedad coronaria prematura (antes de los 55 años en los hombres y de 65 en las mujeres) en familiares de primer y segundo grado

2.- Cálculo del IMC, por la fórmula antes indicada.

3.- Tensión arterial: Se recogerá en el brazo derecho, tras 5 minutos de descanso en posición supina, con los brazos apoyados a la altura del corazón. Se hará con un esfigmomanómetro de mercurio y se definirá la presión sistólica por la aparición del primer sonido (Fase 1 de Korotkoff) y la diastólica por su desaparición (Fase 5 de Korotkoff). Se harán dos mediciones a intervalos de 2 minutos y si difieren en más de 5mm se hará una tercera y se obtendrá la media. Los enfermos que sigan tratamiento antihipertensivo previo se considerarán hipertensos, independiente de sus cifras tensionales al iniciar el estudio. Se considerará definitiva la media de las dos últimas determinaciones. Se considerarán hipertensos los individuos con tensiones iguales o superiores a 140/90 (75).

4.- Consumo de tabaco. Se valorará el tipo y cantidad diaria media de consumo.

5.- Diabetes mellitus. Se hará este diagnóstico ante la existencia de los síntomas clásicos de diabetes, junto a una inequívoca elevación de glucemia, no necesariamente en ayunas (>200 mg/dl). Asimismo se considerarán como tales los pacientes con glucemia en ayunas igual o superior a 126 mg/dl, en dos ocasiones

distintas y si la glucemia, tras la sobrecarga de 75 gramos orales de glucosa, llega a 200 mg a las 2 horas (62). Para ello se les practicará, a todos los pacientes, una sobrecarga oral de 75 gramos de glucosa (extracciones basal, 30, 60, 90, 120 minutos). Los enfermos que siguieran tratamiento para la enfermedad, se diagnosticarán de diabetes sin necesidad de que cumplan tales requisitos.

5.- Consumo de alcohol. Se recogerá la cantidad y tipo de bebidas, cuantificándolo en gramos, según la media de contenido de alcohol en las distintas bebidas alcohólicas (cerveza 4% de contenido alcohólico; vino joven 9%, vino fino 16 %; vino tinto 12 %; bebidas espirituosas 50%). Se considerará exceso de consumo la toma de >30 g/día de alcohol.

6.- Toma de medicación. Se indicarán todos los fármacos, en especial antihipertensivos (IECA, antagonistas del calcio, betabloqueantes), nitritos, antiagregantes e hipolipemiantes.

7.- Obesidad: Se considerará obesidad cuando los sujetos presenten un aumento >10% respecto de su peso ideal.

8.- Inactividad física: Se considerará la presencia de inactividad física si se camina <1 km/día o se realiza el trabajo diario sin ningún ejercicio físico.

b.- Exploraciones complementarias:

1.- Bioquímicas: Las siguientes determinaciones se harán en una extracción de sangre venosa, tras 12 horas de ayuno, en decúbito supino y sin compresión. Tras la extracción se procesarán las muestras de modo convencional, centrifugándolas y transportándolas en hielo para su estudio inmediato. Se conservarán alícuotas de las muestras obtenidas, conservándolas a -80°C .

1.- Glucosa. Se hará por el método de la glucosa oxidasa (Para el diagnóstico de diabetes mellitus del adulto ver el apartado anterior).

2.- Insulinemia basal y a los 60 y 120 minutos de una sobrecarga oral de glucosa.

3.- Colesterol total. Se determinará por un método enzimático (77). Se considerará que hay una hipercolesterolemia, subsidiaria de tratamiento, cuando el LDL colesterol, según la fórmula de Friedewald, sea igual o superior a 130 mg/dl. Si

durante el desarrollo del estudio aparecieran evidencias de que el nivel de tratamiento debe ser modificado se actuará con ese criterio.

4.- Triglicéridos totales. Se considerará que existe hipertrigliceridemia cuando los triglicéridos sean superiores a 200 mg/dl. Se determinará por un método enzimático (78).

5.- HDL colesterol. Se considerará que existe un descenso de HDL cuando su valor esté por debajo de 35 mg/dl en los hombres y de 45 mg/dl en las mujeres. El método utilizado será el de medición directa (79).

6.- Urea.

7.- Acido úrico.

8.- Hemograma: Incluirá la determinación de hematíes, leucocitos y fórmula, y plaquetas.

9.- Determinaciones especiales en los individuos cuya patología obligue a un control específico: Hemoglobina glicosilada en los diabéticos, CPK, GOT y FA en los tratados con hipolipemiantes y sodio y potasio en los hipertensos y tratados con diuréticos e IECA.

2.- **Electrocardiograma de esfuerzo:** En el momento de asignarse a un grupo de dieta se le practicará un electrocardiograma de esfuerzo y un electrocardiograma de 12 derivaciones. La frecuencia cardiaca se obtendrá del electrocardiograma de reposo. Estos electrocardiogramas se repetirán anualmente.

3.- **Ecocardiografía:** Se practicará en el estudio inicial del enfermo. **Se repetirá anualmente ó igual que la ecografía??.**

4.- **Ecografía carotídea:** Se practicará en el estudio inicial del enfermo, a la mitad y al finalizar el estudio.

1.5 Recogida de datos

Todos los datos de screening (información en el tiempo 0) serán recogidos en los correspondientes cuadernos de recogida de datos así como en una tabla de Excel.

1.6 Asignación del código del estudio

Una vez que el paciente acepta participar en el estudio se le asignará un código que consistirá en las iniciales del paciente seguida de un número de orden consecutivo.

1.7 Procedimiento de Aleatorización

El paciente será aleatorizado y asignado a una de las dos dietas del estudio. Para que la adscripción a ambas dietas quede bien equilibrada, la aleatorización se hará por las siguientes variables:

- 1.- Hombre o mujer
- 2.- Tener menos de 60 años o edad superior.
- 3.- Haber o no sufrido un infarto de miocardio previo.

Con esta distribución resultarán 8 grupos distintos.

Grupos de aleatorización, resultantes de aplicar los criterios de selección.

Grupos de aleatorización			
Hombres <60 años, sin IAM previo	Hombres <60 años, con IAM previo	Mujeres <60 años, Sin IAM previo	Mujeres <60 años, con IAM previo
Hombres >60 años, sin IAM previo	Hombres >60 años, con IAM previo	Mujeres >60 años, Sin IAM previo	Mujeres >60 años, con IAM previo

Procedimiento de aleatorización.

Se realizará una aleatorización fija, estratificada en bloques manteniendo a ciegas todo el proceso de aleatorización por parte de los investigadores que han de participar en la recolección de los datos y en el tratamiento de los enfermos. Este proceso de aleatorización será supervisado por un organismo Internacional de reconocido prestigio en el campo de la Epidemiología e Investigación Clínica (Escuela Andaluza de Salud Pública) que conocerá con todo detalle todo el proceso de aleatorización de los enfermos.

Se establecerá un grupo de trabajo que será el encargado de realizar todo el proceso de aleatorización de los enfermos y que será independiente y actuará a ciegas del grupo de trabajo encargado de tratar y del seguimiento de los enfermos.

Grupos de Aleatorización: (1=NCEP; 2= OLIVA)

1. Hombres <60 años sin IAM previo

1122 2211 1212 2121 1221 2112 2121 1221 2112 1122 2211 1212
1221 2112 1122 2211 1212 2121 1212 2121 1221 2112 1122 2211
2112 1212 2121 1221 1122 2211 1122 2121 1221 2112 2211 1212
1212 2121 1221 2112 2211 1122 2121 1221 2112 1122 1212 2211

2. Hombres <60 años con IAM previo

1221 2112 1122 2211 1212 2121 1212 2121 1221 2112 1122 2211
1212 2121 1221 2112 2211 1122 2121 1221 2112 1122 1212 2211
1122 2211 1212 2121 1221 2112 2121 1221 2112 1122 2211 1212
2112 1212 2121 1221 1122 2211 1122 2121 1221 2112 2211 1212

3. Hombres >60 años sin IAM previo

2112 1212 2121 1221 1122 2211 1122 2121 1221 2112 2211 1212
1221 2112 1122 2211 1212 2121 1212 2121 1221 2112 1122 2211
1212 2121 1221 2112 2211 1122 2121 1221 2112 1122 1212 2211
1122 2211 1212 2121 1221 2112 2121 1221 2112 1122 2211 1212

4. Hombres >60 años con IAM previo

1212 2121 1221 2112 2211 1122 2121 1221 2112 1122 1212 2211
1122 2211 1212 2121 1221 2112 2121 1221 2112 1122 2211 1212
2112 1212 2121 1221 1122 2211 1122 2121 1221 2112 2211 1212
1221 2112 1122 2211 1212 2121 1212 2121 1221 2112 1122 2211

5. Mujeres <60 años sin IAM previo

1122 2211 1212 2121 1221 2112 2121 1221 2112 1122 2211 1212
2112 1212 2121 1221 1122 2211 1122 2121 1221 2112 2211 1212
1221 2112 1122 2211 1212 2121 1212 2121 1221 2112 1122 2211
1212 2121 1221 2112 2211 1122 2121 1221 2112 1122 1212 2211

6. Mujeres <60 años con IAM previo

1221 2112 1122 2211 1212 2121 1212 2121 1221 2112 1122 2211
2112 1212 2121 1221 1122 2211 1122 2121 1221 2112 2211 1212
1122 2211 1212 2121 1221 2112 2121 1221 2112 1122 2211 1212
1212 2121 1221 2112 2211 1122 2121 1221 2112 1122 1212 2211

7. Mujeres >60 años sin IAM previo

1212 2121 1221 2112 2211 1122 2121 1221 2112 1122 1212 2211
1122 2211 1212 2121 1221 2112 2121 1221 2112 1122 2211 1212
2112 1212 2121 1221 1122 2211 1122 2121 1221 2112 2211 1212
1221 2112 1122 2211 1212 2121 1212 2121 1221 2112 1122 2211

8. Mujeres >60 años con IAM previo

1221 2112 1122 2211 1212 2121 1212 2121 1221 2112 1122 2211
2112 1212 2121 1221 1122 2211 1122 2121 1221 2112 2211 1212
1212 2121 1221 2112 2211 1122 2121 1221 2112 1122 1212 2211
1122 2211 1212 2121 1221 2112 2121 1221 2112 1122 2211 1212

2. INTERVENCIÓN DIETÉTICA

El objetivo de este estudio es comparar dos tipos de dietas, la dieta mediterránea con un 35% de calorías en forma de grasa (22% grasa monoinsaturada, 6% grasa poliinsaturada, 7% grasa saturada), 15% proteínas y 50% carbohidratos, frente a la dieta recomendada por el National Cholesterol Education Program y la American Heart Association con un 28% de grasa total (8% grasa saturada, 12% grasa monoinsaturada, 8% grasa poliinsaturada), 15% proteínas y 55% carbohidratos. En ambas dietas el contenido de colesterol se ajustará a menos de 300 mg/día. El objetivo consiste no en comparar dos tipos de dieta definidas por un porcentaje de nutrientes determinados, sino dos patrones diferentes de alimentación o dos pirámides alimenticias diferentes: el patrón de alimentos de la pirámide de dieta mediterránea frente al patrón alimenticio recomendado por la American Heart Association.

Ambas dietas terapéuticas deben aportar una diversidad de alimentos de todos los tipos: verduras, frutas, cereales, patatas, legumbres, productos lácteos, carnes y pescados. (**Descripción de las dietas –Ver Apartado 5; sub-apartado 2**).

3. SEGUIMIENTO DE LA POBLACION

Durante el seguimiento del enfermo se harán revisiones o controles periódicos de dos tipos, los dietéticos y las revisiones clínicas. Ver Tabla 5 (en apartado IV.5.- Plan de trabajo).

A.- Controles dietéticos y nutricionales programados:

Los controles dietéticos pretenden garantizar que el aporte nutricional sea adecuado y que se asegure la adherencia del enfermo a la dieta prescrita. Para ello se contará con un/una dietista. Los controles programados (Ver apartado 6) son los siguientes:

1.- Seguimiento telefónico bimensual: Consistirá en una llamada telefónica, realizada por el/la dietista, para reforzar el seguimiento de la dieta y resolver problemas puntuales que puedan surgir. La duración de la conversación telefónica será de unos 10 minutos.

2.- Seguimiento nutricional cuatrimestral

Esta consulta la llevará a cabo el/la dietista, como complemento de la consulta clínica. En ella (B.- Controles clínicos) se revisará la información proporcionada por la dietista, sobre los controles bimensuales antes indicados. Así se harán las oportunas correcciones, de forma inmediata, para asegurar la buena adherencia al protocolo. La duración de esta revisión, en la que se incluirán consejos para reforzar el seguimiento nutricional, será de 20 minutos. En esta consulta se valorarán los parámetros antropométricos, incluidos en el estudio

B.- Controles clínicos

1.- Control por los médicos responsables del seguimiento general: Esta consulta de medicina interna, atendida por un especialista, prestará atención a cualquier aspecto médico relacionado con el seguimiento del enfermo. Tendrá carácter cuatrimestral y vigilará todas eventualidades y cambios evolutivos relacionados o no con la enfermedad fundamental, en especial en lo que respecta al seguimiento y control de los factores de riesgo, los procesos intercurrentes agudos y la aparición de cualquier otro proceso que pueda influir en el protocolo nutricional. El enfermo llevará un diario en el que recogerá cualquier fenómeno nuevo que modifique su vida normal, tanto de significado clínico como la necesidad de tomar cualquier fármaco no programado o el consumo de fármacos a demanda, como los nitratos. En esta consulta se cumplimentarán los cuadernos de recogida de datos, para facilitar la revisión cardiológica. Se completará con una extracción de sangre, en ayunas, para completar la evaluación bioquímica. Se calcula que el tiempo consumido en la consulta de seguimiento será de cuarenta minutos.

2.- Control cardiológico: Esta consulta será realizada por un especialista en cardiología. Los enfermos acudirán tras ser controlados en la consulta general, donde se habrán previamente cumplimentado los cuadernos de recogida de datos. La consulta cardiológica tiene como fin homogeneizar el manejo del enfermo y prestará especial atención al diagnóstico de los posibles nuevos eventos y a su

tratamiento. Con ese objetivo se realizará una revisión cuatrimestral sistemática, que se completará con una consulta de libre acceso por parte del enfermo. Para ello acudirá a la consulta de medicina interna a través de la cual se le facilitará una cita, si los síntomas apreciados por el enfermo se consideran de carácter cardiológico. La demanda de esta segunda modalidad se ha calculado pensando en que puedan surgir un 22% de problemas nuevos evaluables, durante el primer año de seguimiento, y un 7% en los años sucesivos. La consulta se completará con un electrocardiograma en reposo (uno anual, seis en total), una prueba de esfuerzo (a los cuatro meses del inicio y uno anual) o un ecocardiograma (cuatro en total). Se investigarán específicamente los datos relacionados con los “PUNTOS CLÍNICOS FINALES” (IV.- Diseño Experimento, 2: Puntos clínicos finales). La duración de la consulta programada se calcula en veinte minutos y la consulta de demanda en 30 minutos.

3.- Control por un cardiólogo independiente: Los datos clínicos recogidos previamente serán revisados por el cardiólogo, ocupado de atender un episodio, serán revisados por un cardiólogo diferente, que de modo independiente analizará los Cuadernos de Recogida de Datos. Dicha valoración la hará sin conocer el grupo de estudio al que pertenece el paciente y decidirá si un episodio determinado cumple los criterios para ser considerado un episodio clínico final. Su labor inicial y de seguimiento se calcula que ocupará un tiempo de 3 horas diarias.

C.- Datos complementarios de control general

- a.- Colesterol LDL (Control cuatrimestral)
- b.- Colesterol HDL (Control cuatrimestral)
- c.- Glucemia (Control cuatrimestral)
- d.- Curva de glucemia (Control anual)
- e.- Curva de insulinemia (basal, 60 y 120 minutos): Inicial, intermedia y final
- f.- Control de tratamiento diurético cuatrimestral (creatinina, sodio, potasio), aplicable a los enfermos con dicho tratamiento.
- g.- Control hipolipemiante (GOT, GPT, CPK) para enfermos con dicho tratamiento.

h.- Hemoglobina glicosilada: Control cuatrimestral a los diabéticos.

i.- Creatinina y ácido úrico: (Control cuatrimestral)

j.- Ecografía carotídea de control (4 por enfermo).

k.- Electrocardiograma de esfuerzo a los cuatro meses del inicio del estudio y posteriormente control anual (5 por enfermo).

l.- Electrocardiograma de reposo, cuando no le corresponda el electrocardiograma de esfuerzo (10 por enfermo).

m.- El resto de las exploraciones, para el estudio de la enfermedad coronaria, como el estudio isotópico o cateterismo, se supeditarán a las indicaciones específicas de cada una.

4. PLAN GENERAL DE TRABAJO

Con el material de cada enfermo se elaborará un CRD, en el que se incluirán los protocolos clínicos, nutricionales y dietéticos de cada uno.

A.- Desarrollo cronológico del proyecto

Meses del año

1	Consulta médica y nutricional	Aleatorización e inicio
2		
3	Consulta dietética	Control telefónico
4		
5	Consulta médica y nutricional	Control cuatrimestral
6		
7	Consulta dietética	Control telefónico
8		
9	Consulta médica y nutricional	Control cuatrimestral
10		
11	Consulta dietética	Control telefónico
12		

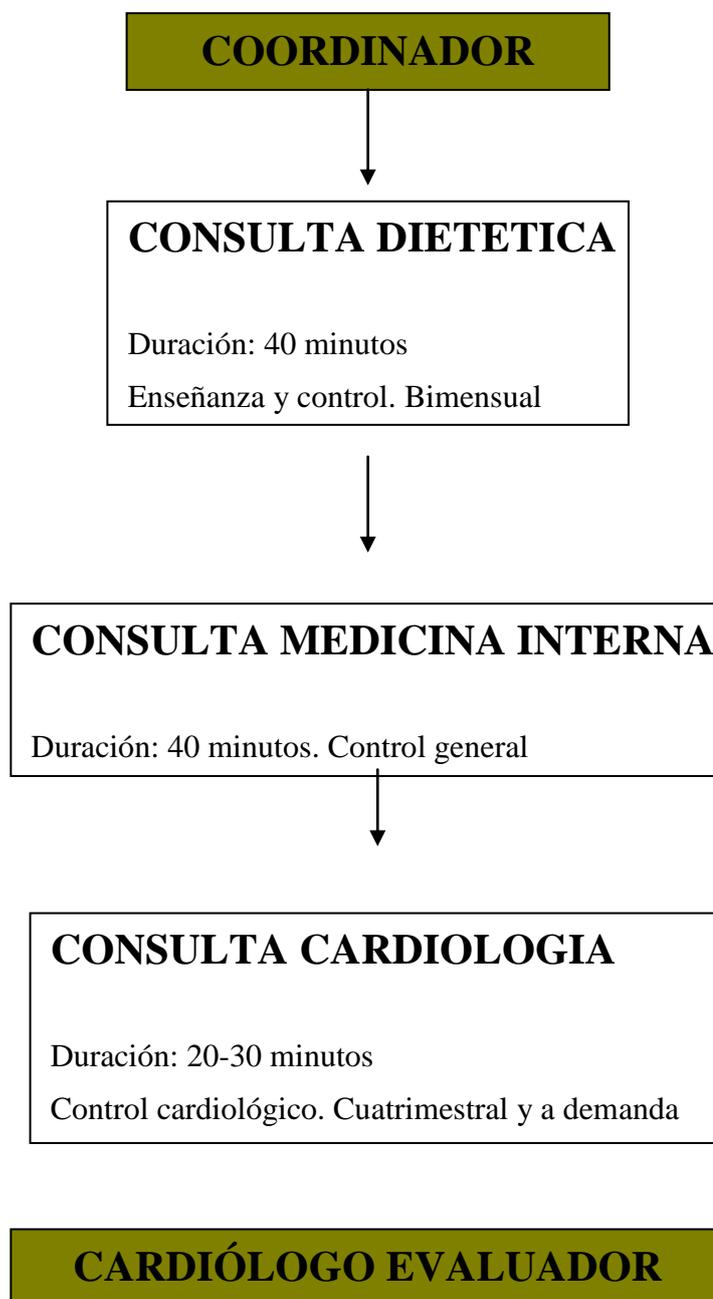
Tabla 4.- Esquema del primer año de seguimiento. Los años sucesivos guardarán el mismo esquema, sustituyendo la “Selección y aleatorización” por “Control cuatrimestral”.

Se ha calculado una tasa mínima de reclutamiento de 9 enfermos semanales, con lo que el tiempo necesario será de un máximo de 24 meses. Dicho reclutamiento se hará con enfermos diagnosticados en el Hospital Universitario Reina Sofía. En caso de que a los 12 meses no se hayan incluido el 50% de los enfermos se recurrirá a otros centros regionales. Se prevé realizar un análisis intermedio hacia los 40 meses de iniciar el (se calcula que para entonces se estará en una media de seguimiento de 2,5 años) para investigar si la tasa de recurrencias del grupo control está dentro de lo previsto. En caso de que no se cumpla dicha predicción se recalculará el tamaño de muestra, de acuerdo con los criterios indicados en el apartado IV.1.A.-).

B.- Tarea de los investigadores y organización del trabajo.

El diseño general del estudio implica la existencia de cuatro consultas, dos para los médicos responsables del seguimiento general, una para el seguimiento cardiológico y una para el/la dietista, de acuerdo con el siguiente esquema general.

Tabla 5: Esquema del organigrama propuesto para el seguimiento.



1.- Coordinador:

Será el responsable de los CRD. Se ocupará de coordinar la marcha del estudio, asegurándose de que cada uno cumple el objetivo definido. Especial interés se prestará al control de los puntos más críticos del estudio, como es la aplicación de los criterios de inclusión y exclusión, cumplimentación de los cuadernos de recogida de datos, recogida y manejo de muestras biológicas,

archivado del material y seguimiento personal de los enfermos. En este sentido arbitrará un sistema que le permita conocer, en el menor tiempo posible, cualquier eventualidad que surja en la evolución de los enfermos, en especial si estos han sido atendidos en el sistema asistencial convencional. Se ocupará de que sea adecuado el manejo de las muestras y de integrar el conjunto del estudio. En caso de surgir alguna necesidad asistencial deberá estar disponible para resolverla. Su ocupación se calcula en 3 horas diarias.

2.- Consulta de Medicina Interna. Esta consulta se organizará con especialistas de medicina interna, y serán responsables del seguimiento clínico de los enfermos. Para ello habrán de tener experiencia en el manejo de este tipo de pacientes, y por tanto tener capacidad y dedicación para interpretar cualquier proceso clínico, relacionado o no con el ensayo. Las consultas programadas serán cuatrimestrales y canalizarán y atenderán las que puedan surgir a demanda. Se pretende que cada especialista que participe sea el médico responsable de un grupo de enfermos. La prevista de esta consulta es de 40 minutos.

3.- Consulta de cardiología: Esta consulta la realizará un cardiólogo, quien valorará y garantizará la información necesaria para que el evaluador externo pueda realizar su trabajo. La consulta tendrá el doble carácter de programada y a demanda. La consulta programada será, durante el primer año, de carácter cuatrimestral y durante el resto del seguimiento será anual. La demanda estará determinada por la aparición de manifestaciones clínicas, que se consideren cardiológicas. Dicha consideración se la dará el internista responsable del enfermo. El cardiólogo desconocerá el tipo de dieta que sigue el enfermo. La duración prevista será de 20 minutos. Las posibles consultas a demanda se han calculado estimando un número de potenciales episodios del 22% en el primer año y 7% para los años siguientes y se calculan 30 minutos para cada una.

4.- Control por dos cardiólogos distintos: Los datos clínicos y exploratorios, tanto diagnósticos como de seguimiento, serán revisados por dos cardiólogos distintos. Uno es el asistencial y otro ajeno al seguimiento. Ellos serán

los que determinarán que episodios serán susceptibles de ser considerados como evaluables, dentro de los objetivos del estudio. Se calcula que esta labor ocupará 3 horas diarias.

5.- Dietista. Realización de un control telefónico aproximadamente cada 2 meses y un control personal, en consulta, también cada 2 meses. La labor de control telefónico la realizará sin horario específico y supondrá 25 llamadas telefónicas, de 10 minutos, por paciente. Además realizará el control de encuesta personal (cada una durará 20 minutos y serán 20 en 5 años). El tiempo total de la labor del dietista, en consulta y teléfono, será de unas 11 horas por enfermo, totalizando 9467 horas.

6.- Equipo de personal auxiliar: Se incluye el personal de enfermería, un becario o un técnico de laboratorio, personal de secretaría y de control de la gestión. Cada uno llevará a cabo las labores propias de su profesión, desde la introducción de la información en la base de datos, ayuda en la consulta al médico, extracción, manejo y archivo de muestras biológicas. La dedicación horaria se señala en el apartado de presupuesto.

5. EVALUACIÓN NUTRICIONAL. PLAN DE INTERVENCIÓN DIETÉTICA

1.- ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN CORPORAL Y ESTADO NUTRICIONAL

1.1. Protocolos antropométricos: Peso, talla, circunferencias y pliegues

1.1.1. Equipamientos

El peso corporal deberá ser determinado usando una balanza de resorte con una precisión de 100 gramos, y cuya calibración deberá ser comprobada al inicio de cada de evaluación.

Un estadiometro será usado para medir la estatura de los participantes en cm.

Una cinta métrica metálica flexible pero no extensible será utilizada para la medición de los perímetros corporales y un plicometro.... Será usado para la determinación del grosor de los pliegues cutáneos.

1.1.2. Método antropométrico

Las medidas antropométricas serán efectuadas en el hemicuerpo longitudinal derecho o en aquel dominante para el individuo, en tanto que los pliegues cutáneos se realizaran por triplicado, utilizándose para la tabulación y construcción de índices los valores correspondientes a la media aritmética. Todas las mediciones se realizarán con la ayuda de un controlador o ayudante, cuya función fue colaborar en el registro escrito de los datos obtenidos sobre la pro-forma antropométrica, a la vez que repetirá los mismos en voz alta, a fin de reducir la posibilidad de errores durante la escritura.

1.1.2.1. Peso corporal

- **Peso:** para su medición se debe controlar que la balanza esté calibrada y en el registro cero, luego el sujeto se para en el centro de la misma sin ningún tipo de apoyo y con el peso distribuido entre ambos pies. La cabeza deberá estar elevada y los ojos mirando directamente hacia delante.

Debido a que el peso corporal muestra una variación diurna de aproximadamente 2 kilogramos en los adultos (Summer & Whitacre, 1931) se recomienda efectuar las mediciones regularmente por la mañana, momento en el cual se obtienen los valores más estables del día; es decir doce horas después de haber ingerido los alimentos y luego del vaciado urinario

(inmediatamente antes de la impedancia bioeléctrica y la evaluación del gasto energético).

1.1.2.2. Estatura

- **Estatura o Talla:** es la distancia entre el vértex y las plantas de los pies del estudiado, en centímetros. Esta medición requiere que el sujeto se pare con los pies y los talones juntos, la cara posterior de los glúteos y la parte superior de la espalda apoyada en el estadiómetro. Además se debe ubicar la cabeza en el plano de Frankfort, a partir de lo cual no necesita estar tocando el estadiómetro, para ello el evaluador coloca las manos debajo de la mandíbula del sujeto con los dedos tomando los procesos mastoideos para alinear horizontalmente el arco orbital inferior con el trago (protuberancia cartilaginosa superior de la oreja).

A continuación, se le pide al sujeto que respire hondo y mantenga la respiración para compensar el acortamiento de los discos intervertebrales de la posición erecta, y mientras mantiene la cabeza en el plano de Frankfort el anotador coloca la pieza triangular en escuadra firmemente sobre el vértex, apretando el cabello, para luego tomar el valor de la medida una vez retirado el sujeto.

1.1.2.3. Perímetros o circunferencias

- **Perímetro de Abdomen mínimo o cintura:** esta medición se realiza a nivel del punto más estrecho entre el último arco costal y la cresta ilíaca. Si la zona más estrecha no es aparente, entonces la lectura se realiza en el punto medio entre estas dos marcas. El evaluador se para enfrente del sujeto para localizar correctamente la zona más estrecha o reducida. La medición se realiza al final de una espiración normal, con los brazos relajados a los costados del cuerpo.

- **Brazo relajado:** el perímetro del brazo colocado en posición relajada al costado del cuerpo, se mide al nivel de la línea media acromial-radial. La cinta debe colocarse perpendicular al eje longitudinal del húmero.

- **Pantorrilla:** es el máximo perímetro de la pantorrilla. El sujeto se para de espaldas al evaluador en una posición elevada, por ejemplo en un cajón, con el peso del cuerpo distribuido equitativamente en ambos pies. La posición elevada facilitará al evaluador alinear los ojos con la cinta. La medición se realiza en la cara lateral de la pierna. Se debe contornear la cinta alrededor de la pantorrilla en la forma descrita. El máximo perímetro se encuentra usando los dedos medios para manipular la posición de la cinta en una serie de mediciones hacia arriba y abajo hasta identificar la circunferencia máxima.

1.1.2.4. Pliegues cutáneos

- **Pliegue Tricipital:** este pliegue se toma con el pulgar y el índice izquierdos en la marca de corte posterior señalada sobre la línea media acromial-radial. El pliegue es vertical y paralelo al eje longitudinal del brazo. El mismo se toma en la superficie más posterior del brazo, sobre el tríceps, cuando se ve de costado. El sitio marcado debería poder verse de costado, indicando que es el punto más posterior del tríceps, mientras se mantiene la posición anatómica (al nivel de la línea acromial-radial media). Para la medición del brazo, el individuo debería estar relajado con la articulación del hombro con una leve rotación externa, y el codo extendido al costado del cuerpo.

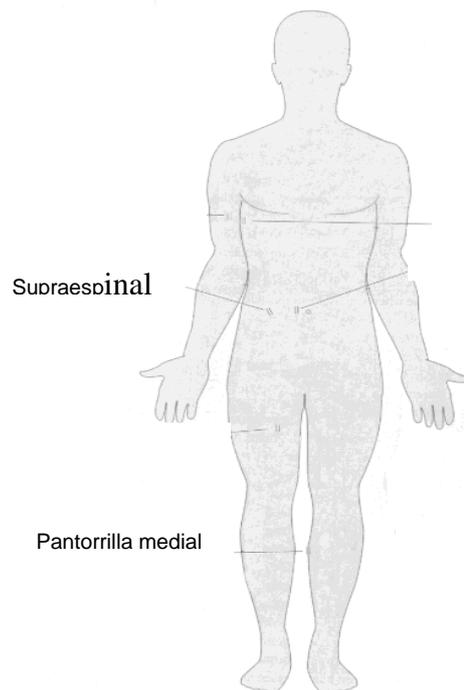
- **Pliegue Subescapular:** el sujeto debe pararse con los brazos a los costados. El pulgar palpa el ángulo inferior del omóplato para determinar el punto más inferior sobresaliente. El pliegue de dos centímetros, se toma con el pulgar e índice izquierdos en el sitio marcado, en una dirección que se desplaza lateralmente y en forma oblicua hacia abajo, a partir de la marca subescapular, en un ángulo (aproximadamente de 45 grados), determinado por las líneas naturales de pliegue de la piel.

- **Pliegue Supraespinal:** este pliegue fue denominado originalmente por Heath y Carter (1967) como suprailíaco, pero actualmente es conocido como supraespinal (Carter & Heath, 1990). El mismo es levantado por compresión en donde la línea imaginaria que va desde la marca íleoespinal al borde axilar anterior se intercepta con la línea que se proyecta, en sentido

horizontal, desde el borde superior del hueso ilíaco, a nivel de la marca o punto iliocrestídeo. En los adultos, se ubica a 5 o 7 centímetros por encima del punto o marca ileoespinal, dependiendo del tamaño del sujeto, pero podía estar a sólo 2 cm en un niño. El pliegue sigue una tendencia de dirección medial, hacia abajo y hacia adentro, en un ángulo de aproximadamente 45 grados.

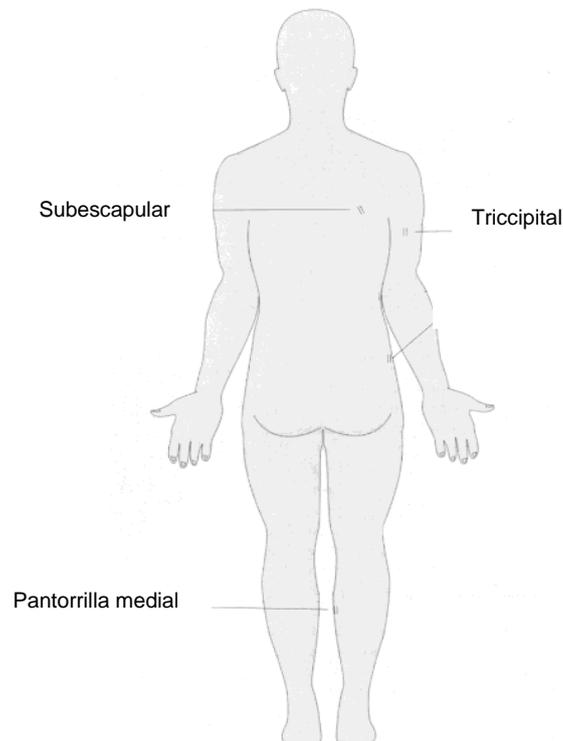
- **Pliegue medial de la pierna o pantorrilla medial:** Con el sujeto ya sea sentado o con el pie apoyado en una caja (rodilla a 90 grados), y con la pantorrilla relajada, se toma el pliegue vertical en la cara medial de la pantorrilla, a nivel de su perímetro máximo. El mismo será determinado durante la medición de los perímetros, marcándolo en la cara medial de la pantorrilla durante este procedimiento.

Figura. Ubicación de los sitios para la medición de los pliegues cutáneos (vista anterior).



Fuente: Norton K. 2000.

Figura. Ubicación de los sitios para la medición de los pliegues cutáneos (vista posterior).



Fuente: Norton K. 2000.

1.2. Impedancia bioeléctrica

1.2.1. Condiciones de aplicación

Las condiciones estandarizadas para la medición, incluyen:

- a. Paciente en posición decúbito dorsal con una leve abducción de sus miembros, sobre superficie no conductora, durante al menos 4 minutos antes de la medición.
- b. Limpieza de piel en la zona de colocación de los electrodos, con alcohol anhidro.
- c. Temperatura ambiental de 20 a 35° centígrados.
- d. Ayuno nocturno de por lo menos 10 a 12 horas
- f. Evitar ejercicios extenuantes, alcohol o diuréticos durante las 24 horas previas

2.- PLAN DE INTERVENCIÓN DIETÉTICA

En el presente estudio, la intervención dietética será realizada en tres fases: en la fase I los sujetos completarán una historia dietética constituida por diferentes cuestionarios aplicados en la entrevista inicial pre-intervención; en la fase II, los sujetos, una vez asignados de forma aleatoria a cada grupo de intervención, serán instruidos para el cumplimiento de uno de los dos modelos dietéticos correspondientes; es decir a una alimentación mediterránea rica en aceite de oliva o a una dieta control pobre en grasas; y la fase III será realizada de forma simultánea a la intervención dietética propiamente dicha y consistirá en un proceso de supervisión del cumplimiento y adherencia a las dietas prescritas; así como en el registro de los datos nutricionales resultantes de dicha intervención.

2.1. Fase I. Historia dietética

El objetivo de esta fase es obtener un conocimiento detallado de la ingesta dietética previa del paciente, incluyendo su ingesta calórica aproximada, selección de alimentos, métodos de cocción y elaboración, así como cualquier otra información referente a sus preferencias y aversiones alimentarias. Para ello, tras la valoración de la composición corporal y nivel de actividad física, los participantes serán citados a una consulta dietética inicial, en la que una dietista registrará su ingesta dietética previa usando un Cuestionario de Frecuencia de Consumo de Alimentos. Seguidamente se instruirá al paciente sobre los pasos a seguir para cumplimentar un diario de 3 días de consumo de alimentos. La duración de esta consulta nutricional será de aproximadamente 45 minutos

2.1.1. Cuestionario de Frecuencia de Consumo de Alimentos

El paciente deberá informar sobre la cantidad y frecuencia con la que consumió determinados alimentos o grupos de alimentos en el periodo previo de un año retrospectivo a la entrevista en cuestión. Para ello usará un formulario estandarizado de registro de alimentos según frecuencia semanal, mensual y anual de alimentos.

2.1.2. Diario de la ingesta alimentaria de 3 días

Los pacientes deberán registrar su ingesta diaria de alimentos durante dos días de la semana (lunes a jueves) y en otro del fin de semana (sábado o domingo), usando un formulario registro diario. El día viernes no se incluye debido a la ambigüedad que existe en ser considerado un día de semana o de fin de semana. A fin de que el paciente registre la cantidad aproximada de los alimentos o comidas ingeridas, en la consulta dietética se mostrarán al paciente modelos artificiales y/o fotografías de alimentos en distinta escala de racionamiento y peso.

El investigador deberá recibir los formularios de registro de 3 días tan pronto como sean completados por el paciente y verificarlos la factibilidad de los pesos y raciones registrados, así como cualquier otra duda que surja durante la observación de la información dietética.

2.2. Fase II. Prescripción de los modelos dietéticos

Una vez finalizado el análisis cuali-cuantitativo de la ingesta dietética previa referida por el paciente, se citará al paciente a una segunda consulta dietética con una duración estimada de 30 minutos, en la que se le entregará por escrito un conjunto de recomendaciones e instrucciones (*Ver adelante: "Método de intervención dietética"*) que permitirán el cumplimiento de uno de los modelos dietéticos a estudiar.

2.2.1 Modelos de intervención dietética

Basado en el objetivo de este estudio se deberán prescribir dos tipos de dietas; una de típica mediterránea con un 35% de calorías en forma de grasa (22% grasa monoinsaturada, 6% grasa poliinsaturada, 7% grasa saturada), 15% proteínas y 50% carbohidratos, y otra según la recomendación del National Cholesterol Education Program y la American Heart Association con un 28% de grasa total (8% grasa saturada, 12% grasa monoinsaturada, 8% grasa poliinsaturada), 15% proteínas y 55% carbohidratos. En ambas dietas el contenido de colesterol se ajustará a menos de 300 mg/día. El objetivo consiste no en comparar dos tipos de dieta definidas por un porcentaje de nutrientes determinados, sino dos patrones diferentes de alimentación o dos pirámides

alimenticias diferentes: el patrón de alimentos de la pirámide de dieta mediterránea frente al patrón alimenticio recomendado por la American Heart Association.

Ambas dietas terapéuticas deben aportar una diversidad de alimentos de todos los tipos: verduras, frutas, cereales, patatas, legumbres, productos lácteos, carnes y pescados.

A.- Modelo alimentario siguiendo los criterios del National Cholesterol Education Program y de la American Heart Association.

Deberán seguirse las siguientes normas en lo referente a la elección de alimentos específicos o grupos de alimentos.

a.1 Cereales y derivados (pan, cereales, pasta, patatas, arroz, legumbres). Se deberán consumir entre 6 y 11 raciones diarias. Cada ración corresponde a las siguientes cantidades: 1 rebanada de pan, 30 gr de cereales en seco, ½ taza de patatas, arroz, fideos, legumbres, etc.

Estos alimentos son ricos en hidratos de carbono, aportan proteínas y en general tienen un bajo contenido en grasa saturada y colesterol. La pasta, las legumbres, las patatas, el arroz y las verduras pueden combinarse con pequeñas cantidades de carne magra, pescado o aves para preparar un segundo plato sabroso.

a.2 Verduras (lechuga, maíz, guisante, judías verdes, brócoli, zanahorias, col, apio, tomate, espinacas, calabaza, berenjena, setas, etc.) Se deberá consumir entre 3 y 5 raciones al día. Cada ración corresponde a 1 taza de verdura cruda o ½ taza de las demás.

a.3 Frutas (Naranja, manzana, pera, plátanos, uva, ciruela, melocotón, fresas, melón, kiwi, mango, papaya, etc.) Se deberá consumir entre 2 y 4 raciones al día. Cada ración corresponde a 1 pieza mediana de fruta, ½ taza de fruta cortada o ¾ de taza de zumo de fruta.

a.4 Lácteos desnatados (leche desnatada, yogur desnatado, quesos bajos en grasa). Se deberán tomar entre 2 y 3 raciones al día. Una ración corresponde a una taza de leche desnatada o 30 gr de queso bajo en grasa o queso fresco.

a.5 Carnes magras, carne de ave o pescado. Se deberá consumir hasta 150-180 gr al día. Las carnes magras de la carne de ternera son el solomillo, el bistec redondo, la culata y en el caso del cerdo, la parte central del jamón, el lomo o el solomillo. Debe limitarse toda la grasa visible antes de consumirse y antes de la cocción. En el caso del pollo y pavo debe eliminarse la piel antes de la cocción.

La cantidad de 150-180 g de carne, pescado o carne de ave corresponde a 2 raciones cada una de tamaño aproximado de una baraja de cartas.

El marisco contiene menos grasa que la carne pero algunos tipos como las gambas contienen gran cantidad de colesterol por lo que su inclusión debe limitarse en tanto en cuanto el consumo de colesterol es el recomendado (<300 mg/día).

a.6 Grasa y aceites (Utilizar no más de 6-8 cucharaditas al día incluyendo las utilizadas para la preparación de los alimentos). Utilizar los siguientes aceites en la preparación de los alimentos: canola, maíz, soja, girasol. También se pueden utilizar las margarinas vegetales blandas.

a.7 Frutos secos. El consumo de frutos secos y mantequilla de cacahuete ha de limitarse debido a su riqueza en grasa.

a.8 Huevos. Limitar su ingesta a no más de 2-4 huevos a la semana.

a.9 Varios. Los aperitivos del tipo de galletas crujientes sin ninguna grasa, arroz tostado, rosquillas de pan, etc. son adecuados. Las palomitas de maíz deben elaborarse con una pequeña cantidad de aceite vegetal.

Postres y dulces. Las frutas, el yogur de frutas con poca grasa, los helados de frutas, los sorbetes, las gelatinas y la leche helada sin grasa son opciones adecuadas. Limitar los dulces preparados con leche, chocolate y aceites tropicales.

a.10 Técnicas culinarias. En lo que respecta a las técnicas de preparación de los alimentos debe tenderse a los métodos de menor cocción de las grasas (hervido, horneado, parrilla, hervido al vapor, escaldado sin añadir grasas, eliminación de la grasa de la carne, vertido de las grasas tras la cocción y eliminación de la piel de las aves). Se recomienda el uso de un aceite

rico en ácidos grasos no saturados (girasol, maíz, soja, etc.) con moderación. La sal ha de limitarse en la preparación de sopas, caldos y otros platos sustituyéndola por otras especies.

Dado que los principales orígenes de las grasas saturadas en la dieta norteamericana son las carnes y los productos lácteos ricos en grasas, los pacientes deben limitar el consumo de mantequillas, leche entera y productos realizados con leche entera como los helados, la nata, el queso graso, las carnes grasas como la hamburguesa, las carnes procesadas (salchichas, panceta, etc.), los embutidos ricos en grasa (salami chorizo, salchichón, derivado del jamón) y la piel de las aves.

B.- Modelo de Alimentación Mediterránea.

Deberán seguirse las siguientes normas para conseguir las recomendaciones de una dieta mediterránea:

b.1 Cereales y derivados (pan, cereales, pasta, patatas, arroz, legumbres). Se deberá consumir entre 6 y 11 raciones diarias. Cada ración corresponde a las siguientes cantidades: 1 rebanada de pan, 30 g de cereales en seco, ½ taza de patatas, arroz, fideos, legumbres, etc.

Utilizar pan con todas las comidas. Las legumbres y cereales deben ser la base de los primeros platos en las comidas principales (garbanzos, lentejas, judías, arroz, etc.).

b.2 Verduras (lechuga, maíz, guisante, judías verdes, brócoli, zanahorias, col, apio, tomate, espinacas, calabaza, berenjenas, guisantes, setas, etc.). Se deberá consumir entre 3 y 5 raciones al día. Cada ración corresponde a 1 taza de verdura cruda o ½ taza de las demás. En la dieta mediterránea, un plato de verduras frescas se debe consumir como base fundamental de la alimentación condimentadas con aceite de oliva virgen.

b.3 Frutas (naranja, manzana, pera, plátano, uva, ciruela, melocotón, fresas, melón sandía y cualquier fruta del tiempo). Se deberá consumir entre 2 y 4 raciones al día. Cada ración corresponde a 1 pieza mediana de fruta, ½ taza de fruta cortada o ¾ de taza de zumo de fruta. Como norma general se deberá consumir el equivalente a una pieza de fruta como mínimo en cada una de las dos comidas principales como postre y no utilizar otros postres.

b.4 Lácteos desnatados (leche desnatada, yogur descremado, quesos bajos en grasa). Se deberán tomar entre 2 y 3 raciones al día. Una ración corresponde a una taza de leche desnatada o 30 gr de queso bajo en grasa o queso fresco.

b.5 Grasa y aceites. Utilizar aceite de oliva virgen para las preparaciones culinarias, en especial junto con el pan, tostado o natural, del desayuno y merienda, en la preparación y aderezo de verduras y ensaladas, en el proceso de cocinado de todos los platos (legumbres, verduras, pescado frito, etc.), para la preparación de ciertos platos típicos de la cocina andaluza mediterránea, como el gazpacho y salmorejo. Se deberá tomar diariamente la ración recomendada de aceite de oliva virgen, calculándose que será 60 centímetros cúbicos/persona/día, para los hombres con normopeso, con una ingesta calórica de unos 2,000 Kcal/día. En el caso de las mujeres con normopeso, y de hombres y mujeres con sobrepeso, el consumo de aceite de oliva guardará la proporción adecuada para el aporte calórico global. En la tabla siguiente se ponen varios ejemplos de diferentes dietas y sus proporciones correspondientes de consumo de aceite de oliva. No se debe de consumir ninguna otra grasa y en especial deben ser eliminados otros tipos de aceites, mantequillas, margarinas o derivados grasos.

Tabla. Ejemplos de varias dietas, con contenido calórico diferente y del consumo correspondiente de aceite de oliva.

	Hombres normopeso	Hombres sobrepeso	Mujeres normopeso	Mujeres sobrepeso
Kcal/día	2,000	1,500	1,700	1,200
Aceite de oliva	50 mililitros/día	45 mililitros/día	50 mililitros/día	36 mililitros/día

b.6 Carne de ave o pescado. Se deberán de consumir varias veces a la semana (4-5 veces) pescado y 2 veces/semana (150 gr en cada ración) carne de ave sin piel. Tanto el pescado como la carne de ave se pueden consumir o bien fritos con aceite de oliva o bien a la plancha aunque el pescado se consumirá preferentemente frito con aceite de oliva.

b.7 Huevos. Limitar su ingesta a no más de 2-4 huevos a la semana.

b.8 Frutos secos. El consumo de frutos secos ha de limitarse debido a su riqueza en grasa.

b.9 Carnes rojas. Las carnes magras rojas de ternera son el solomillo, el bistec redondo, la culata y en el caso del cerdo, la parte central del jamón, el lomo o el solomillo. Debe eliminarse toda la grasa visible antes de consumirse y antes de la cocción. Consumir solo ocasionalmente o esporádicamente, es decir varias veces al mes, no más de una vez por semana y por término medio dos veces (150 gr cada ración) al mes.

b.10 Varios. Postres y dulces. Las frutas constituyen el mejor postre a tomar en todas las ocasiones. Los restantes postres realizados con lácteos desnatados, el yogur de frutas con poca grasa, los helados de frutas, los sorbetes, las gelatinas y la leche helada sin grasa son opciones adecuadas a tomar solo esporádicamente en aquellas circunstancias en las que no sea posible tomar una pieza de fruta fresca. Eliminar los dulces preparados con leche, chocolate y aceites tropicales.

Consumir solo los dulces caseros realizados con aceite de oliva, harina y especias (por ejemplo pestiños, magdalenas caseras, etc.)

El consumo de vino tinto con un máximo de 2 copas al día para hombre y 1 copa al día para las mujeres.

b.11 Costumbres culinarias y condimentos. Como norma general se consumirán alimentos frescos evitando conservas. En la dieta mediterránea el eje de las técnicas culinarias se encuentra en el uso del aceite de oliva. Se utilizará aceite de oliva para los fritos (pescado, berenjenas, patatas, huevos, etc.), para rehogar las verduras frescas una vez cocidas, para añadirlo a las verduras frescas y a las ensaladas. También se utilizará el aceite de oliva en la preparación de platos típicos de la cocina mediterránea (salmorejo, gazpacho, etc.), dulces (buñuelos, jeringos, magdalenas, pestiños, etc.) y en la preparación de todos los platos y guisos (cocido, alubias, lentejas, paella, etc.). Igualmente existen una serie de condimentos muy típicos de la cocina y dieta mediterránea de forma que en la condimentación de la mayoría de los platos se utiliza el ajo, la cebolla y el tomate.

b.12 Vino: Se puede consumir vinos de graduación inferior a 16°, en una cantidad que no supere las 3 copas al día para hombres y 2 copas para las mujeres.

Esquema general de consumo de los distintos alimentos en ambas dietas

ALIMENTOS	AHA	MEDITERRÁNEA
Aceite de oliva	NO	≅ 50 cc/día
Aceite de girasol	<30 cc/día	NO
Margarina	12 g/día	NO
Mermelada	50 g/día	NO
Galletas	50 g/día	NO
Cereales y derivados (1)	6-11 raciones/día	6-11 raciones/día Pan en todas las comidas Legumbres (5-4 veces/sem)
Verduras (2)	3-5 raciones/día	3-5 raciones/día frescas
Frutas (3)	2-4 raciones/día	3-4 raciones/día fresca
Lácteos desnatados (4)	2-3 raciones/día	2-3 raciones/día
Carnes rojas (5)	<180 g/día	150 g/2 veces mes
Carne de pollo (5)	<180 g/día	150 g/2 veces/semana
Pescado (5)	<180 g/día	150 g/5 veces/semana
Frutos secos	Esporádicamente, de cualquier tipo	Castañas y nueces en temporada
Huevos	2-4 yemas/semana	2-4 yemas/semana
Postres	Fruta, gelatinas, sorbetes, mermeladas, helados con leche desnatada etc.	Frutas frescas del tiempo
Otros postres	4-5 veces/semana. Yogur, sorbetes, gelatinas, helados desnatados	Muy ocasional. En las celebraciones
Alcohol	NO	2 copas vino/día en hombre 1 copa vino/día en mujer
Costumbres culinarias	Vapor, plancha, horneado, hervidos	Fritos, condimentos (ajo, cebolla, tomate) con aceite de oliva

(1) Una ración equivale a 15-20 gr/de pan, 30 gr de cereales en seco o media taza de legumbres, arroz, fideos o patatas.

(2) Una ración equivale a una taza de verdura cruda o media taza de otras verduras (maíz, guisantes, etc)

(3) Una ración equivale a una pieza mediana de fruta, media taza de fruta cortada o tres cuartos de zumo de fruta.

(4) Una ración corresponde a una taza de leche desnatada o 30 g. de queso bajo en grasa o queso fresco.

(5) A elegir por parte de los paciente uno de ellos para consumir en el día.

2.2.2. Método de intervención dietética

La modificación de los hábitos dietéticos previos del paciente se realizará dependiendo del tipo de comida a ingerir durante el día, considerando dos pautas claves a cumplir: a) un esquema estándar de desayuno, merienda y snacks, que serán fijos en cuanto a la selección, combinación y preparación de alimentos, permitiendo cumplir así con el número de raciones y la variedad de alimentos específicos para cada modelo dietético; y en el que sólo se podrá variar el tamaño de las raciones alimentarias según la ingesta calórica estipulada para cada participante; y b) un modelo de intercambio de alimentos, según equivalencias nutricionales, para la elaboración de los almuerzos y cenas, que permitirá que las personas seleccionen los alimentos y elaboren las preparaciones específicas a cada modelo dietético.

2.3. Fase III. Supervisión y seguimiento dietético

El seguimiento dietético pretende garantizar que el aporte nutricional sea adecuado y que se asegure la adherencia del enfermo a la dieta prescrita durante todo el periodo de duración del estudio. El equipo de dietistas desarrollará esta fase a través de dos tipos de controles sistemáticos y programados:

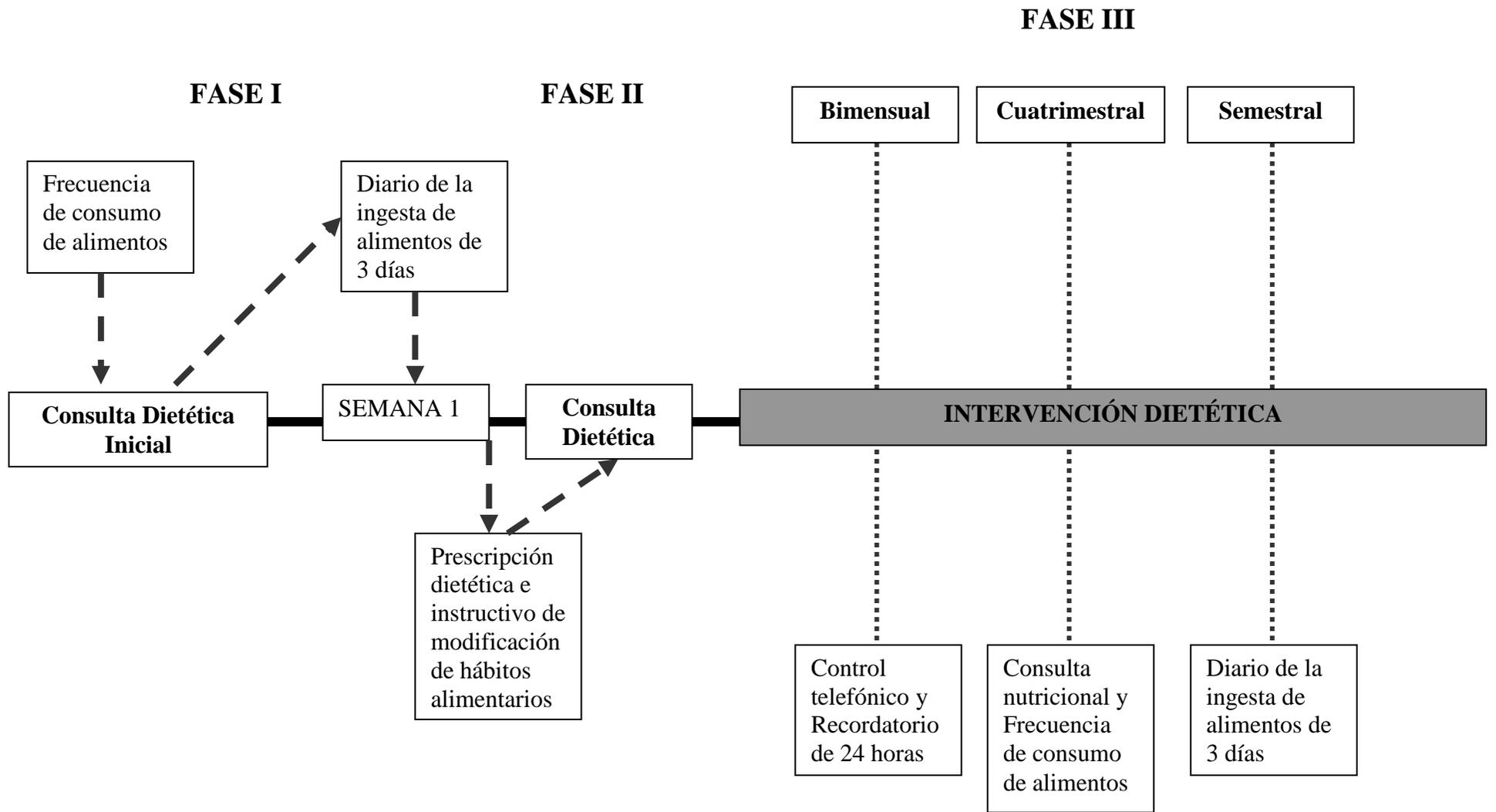
A.- Seguimiento telefónico bimensual: el equipo de dietistas deberá llamar al participante cada 2 meses a fin de reforzar el cumplimiento de la dieta y resolver problemas dietéticos puntuales derivados de la modificación alimentaria prescrita. Cada llamada telefónica tendrá una duración aproximada de 10 minutos, en los que se realizará un recordatorio diario de 24 horas para conocer un día típico de la ingesta dietética y se completará un cuestionario corto con preguntas específicas sobre el cumplimiento de las pautas de inclusión o exclusión de alimentos; así como, sobre posibles modificaciones en otros hábitos de vida (actividad física, laboral, deportiva etc.). La dietista deberá además, reportar posteriormente a la consulta clínica, un resumen de la información nutricional obtenida en estos controles telefónicos a fin de que el

médico pueda realizar también las correcciones o aportes que considere oportuno en las consultas clínicas cuatrimestrales.

B.- Consulta nutricional cuatrimestral: el equipo de dietistas citará a los participantes para una entrevista personal que será complementaria a la consulta clínica cuatrimestral. La dietista utilizará estas sesiones para realizar las correcciones oportunas que surjan tanto de la propia entrevista, como de los controles telefónicos previos; asegurando de esta forma una buena adherencia y cumplimiento de los modelos dietéticos. La duración de la entrevista nutricional será de aproximadamente 30 minutos, en los que se realizará un control antropométrico idéntico al realizado en la fase pre-intervención y se completará un cuestionario de frecuencia cuali-cuantitativa de una semana previa a la entrevista, en el que se solicitará al paciente que enumere las principales preparaciones y raciones consumidas típicamente en las comidas diarias (desayuno, merienda, almuerzo, cena, snacks) durante la semana previa a su entrevista dietética. Este último cuestionario permite obtener una visión general de la adherencia a la dieta, aporta información nutricional y permite realizar correcciones específicas en las comidas particulares en las que se detecte errores o incumplimientos.

Registro diario de alimentos de 3 días

Además de los cuestionarios mencionados anteriormente en los controles telefónicos y entrevistas personales, los participantes deberán completar cada 6 meses de intervención, un diario alimentario de 3 días según el método de pesada de alimentos.



6. PROTOCOLOS PARA EL PROCESAMIENTO, ROTULACION Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

6.1.- Protocolo de muestras

Las determinaciones se llevarán a cabo tras 12 horas de ayuno, en muestras procedentes de extracciones de sangre venosa, manteniendo al paciente en decúbito supino y sin compresión. Las muestras se procesarán de forma convencional, centrifugándolas y transportándolas en hielo para su estudio inmediato y almacenándolas a -80°C .

El desarrollo y seguimiento de este estudio se realizará en dos fases, Pre-intervención y Post-intervención, en las que se realizarán los siguientes procedimientos:

- Determinaciones bioquímicas: glucosa, insulina, colesterol, triglicéridos HDL-C, LDL-C, apo AI, apo B, urea, ácido úrico, hemograma, hemoglobina glicosilada, CPK, GOT, PCR, FA, sodio, potasio.
- Test de función endotelial y aislamiento de células mononucleares
- Cuantificación de citoquinas
- Determinación de parámetros de inflamación y coagulación
- Test resistencia a la insulina.
- Estudio de lipemia postprandial
- Biopsias de tejido graso
- Electrocardiograma de esfuerzo
- Estudio de micropartículas
- Ecocardiografía
- Grosor de la íntima media
- Impedanciometría /DEXA
- Estudio de las micropartículas

6.2 Etiquetado y almacenamiento de las muestras

Las muestras serán almacenadas en tubos, en cuya base se localizarán unos códigos de barras que serán reconocidos por un lector específico, y con tapones de distinto color. Cada uno de estos colores corresponderá a un tipo de muestra.

Tapón violeta: Muestras procedentes de tubos conteniendo EDTA

Tapón azul: Muestra procedentes de tubos conteniendo citrato

Tapón verde: Muestras procedentes de tubos con heparina litio

Tapón rojo: Muestras procedentes de suero

Tapón amarillo: Muestras procedentes de suero SST (con gelosa)

Tapón transparente: Muestra procedentes de tubos con oxalato

Tubos y tabón negros: Almacenamiento de quilomicrones

Tapones blanco: Muestras procedentes de orina

6.3 Protocolo y recogida de muestras de sangre en el test de tolerancia a la glucosa (OGTT)

El test se realizará tras 12 horas de ayuno. Los pacientes no deberán realizar ejercicio ni consumir alcohol el día previo al test.

6.3.1. Recogida de muestras en ayunas

Las muestras de sangre se deben recoger según el siguiente orden:

Numero	Volumen	Color	Tipo de tubo	Analisis
2	10ml	ROJO	SUERO CON GELOSA	Leptina, resistina, adiponectina, CRP, IL-6, TNF α , sICAM, sVCAM, P-selectina
2	4.5ml	ROJO	SUERO	Insulina y c-peptide
9	3 ml	VIOLETA	K3-EDTA	colesterol, TAG , NEFA Plasma apo A1, B, B48, CII, CIII, E DNA.
3	4.5ml	AZUL	CITRATO SÓDICO	PAI-1, t-PA, fibrinogeno, vWF, α -thromboglobulina
3	2ml	GRIS	OXALATO	Glucosa
2	3 ml	VERDE	HEPARINA LITIO	Por determinar
1 bote		BLANCO	ORINA	

La sangre recogida en los tubos K3-EDTA, citrato, oxalato y heparina litio deben ser invertidos 8-10 veces para asegurar que el coagulante se mezcle.

Los tubos de citrato deben estar en hielo antes de la extracción.

Todas las muestras, excepto las recogidas en los tubos de suero, deben ponerse en hielo después de la extracción.

6.3.2 Protocolo del test de sensibilidad periférica a la insulina

Al principio y al final del periodo de intervención dietética se llevará a cabo el estudio de la tolerancia a la glucosa. A las 8:00 h, tras 12 horas de ayuno, se iniciará el test realizando extracciones de sangre a los -30 min. y -15 min. antes de la ingesta de 75 gr. de glucosa. Posteriormente se realizarán extracciones a los 0, 30, 60, 90 y 120 min de la sobrecarga de glucosa.

PROTOCOLO OGTT

Código paciente: _____ ID#: _____ Test: 1 / 2

Peso: _____ Fecha del test: _____

	<i>Tiempo</i>	<i>Tiempo</i>		<i>Glucosa</i>	<i>Insulina</i>
Recogida de muestra	-30		Monitorización de la glucosa 6ml suero +2ml oxalato de fluoruro		
Recogida de muestra	-15		Monitorización de la glucosa 6ml suero +2ml oxalato de fluoruro		
Recogida de muestra	0				
Infusión de glucosa	0		Monitorización de la glucosa 6ml suero +2ml oxalato de fluoruro		
Recogida de muestra	30		Monitorización de la glucosa 6ml suero +2ml oxalato de fluoruro		
Recogida de muestra	60		Monitorización de la glucosa 6ml suero +2ml oxalato de fluoruro		
Recogida de muestra	90		Monitorización de la glucosa 6ml suero +2ml oxalato de fluoruro		
Recogida de muestra	120		Monitorización de la glucosa 6ml suero +2ml oxalato de fluoruro		

6.4.-Protocolo y recogida de muestras en el estudio de lipemia postprandial

Las extracciones de sangre se realizarán en los tiempos 0, 1, 2, y 4 h posterior a la ingesta de la sobrecarga grasa

Numero	Volumen	Color	Tipo de tubo	Análisis
9	3 ml	VIOLETA	K3-EDTA	Glucosa, Colesterol, triglicéridos y apolipoproteínas plasmáticas y colesterol, triglicéridos apo B y retinil palmitato en QM y RQM. Parámetros inflamatorios
1	4.5ml	ROJO	SUERO	Insulina. Parámetros inflamatorios
3	4.5ml	AZUL	CITRATO SÓDICO	Parámetros de coagulación
2	2 ml	Criotubos	Mononucleares (0, 4 y 6h)	Expresión génica y análisis de proteínas
2	2 ml	Criotubos	Biopsias de tejido graso (0 y 4h)	Expresión génica y análisis de proteínas
1 bote	10ml	BLANCO	ORINA	Por determinar

6.4.1 Protocolo del estudio de lipemia postprandial

El estudio de lipemia postprandial será completado en dos fases: pre- y post intervención. A todos los pacientes se les administrará una comida con la misma composición grasa que la consumida durante el periodo de intervención dietético. Se determinarán apolipoproteínas, colesterol y triglicéridos plasmáticos y colesterol, triglicéridos, apo B-100, apo B-48 y retinil plamitato en las distintas fracciones lipoproteicas.

6.4.1.1. Test de sobrecarga grasa con vitamina A

Todos los pacientes serán citados a las 8:00 en la Unidad de Lípidos. A estos se les habrá comunicado que deberán presentarse tras 12 horas de ayuno y sin haber fumado durante este periodo de tiempo ni haber ingerido alcohol en los últimos 7 días. A los pacientes se les administrará en el tiempo 0 una comida grasa compuesta por un gramo de grasa, 7 mg de colesterol y 40 equivalentes de retinol por kilogramo de peso con la siguiente distribución calórica: 65% grasa, 10% proteínas y 25% de carbohidratos. La ingesta se realizará en un tiempo máximo de 20 min. Las extracciones de sangre se realizarán por la vena antecubital, en los tiempos 0, 1, 2 y 4 horas después de la sobrecarga grasa. Durante el estudio postprandial, los pacientes no realizarán ejercicio físico ni consumirán ningún alimento, excepto agua, hasta las 6 h.

6.4.1.2. Extracciones sanguíneas

En cada uno de los tiempos indicados se realizaran extracciones de 32 ml de sangre venosa: 20 ml en tubos conteniendo EDTA (7.5%, 0.072ml de EDTA, BD Vacutainer K3E, Plymouth-UK), 4 ml en un tubo conteniendo Citrato (Tri-Sodium Citrate solution 0.0129M, BD Vacutainer 9NC, Plymouth-UK) manteniendolos a 4°C y 4 mL en tubo de pruebas cruzadas y 4 mL en tubos con gelosa. Todos los tubos se protegerán de la luz. El plasma se separará del resto de células por centrifugación a 2500 rpm durante 15 min a 4°C. La capa de células, recogida en los tubos del tiempo 1, se guardará a -80°C y su finalidad será aislar el ADN. Para minimizar la degradación proteolítica, el plasma procedente de los tubos con EDTA, citrato y suero se introducirá en tubos conteniendo 1µl/ml de phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF, Sigma) 10 mM diluido en isopropanol y 5 µl/ml de aprotinina (Trasylol, Bayer, Leverkusen,

Germany) 1.400 µg/l. Así, se recogerán 4 ml de plasma procedente de tubos con EDTA para aislar los quilomicrones y se almacenarán a -80°C. El resto de plasma y suero procedente de cada uno de los tipos de tubos se almacenará en alícuotas de 300-µl, a -80°C, para posteriormente proceder con los distintos análisis bioquímicos.

6.4.1.3 Preparación del líquido conservante para el aislamiento de lipoproteínas ricas en triglicéridos

Añadir 25 µl de líquido conservante a 500µl (0.5ml) de plasma antes de proceder con la centrifugación.

Materiales:

Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (dihydrate) (EDTA) - Sigma E-1644

Chloramphenicol- Sigma C-0378

Sodium Azide- Sigma S-2002

Gentamicin sulphate- Sigma G-3632

Aprotinin- Sigma A-1153

Benzamidine hydrochloride hydrate- Sigma B-6506

NaCl- Sigma S-9888

3M NaOH

Preparación:

- A 8.8g de NaCl y 1.2g EDTA añadir 40ml de agua destilada
- Mezclar utilizando un agitador automático
- Justar el pH a 7.4-8.4, utilizando 3M NaOH EDTA y NaCl
- Añadir los reactivos en el siguiente orden, esperando siempre a que se disuelva en reactivo previamente incorporado.

- 100mg sodium azide
- 2.75mg of 4TIU/mg aprotinin
- 80mg chloramphenicol (difícil de disolver)
- 160mg benzamidine hydrochloride hydrate
- 80mg gentamicin sulphate

(Algunos de estos reactivos no se disuelven bien, y se deberá utilizar un agitador automático. No calendar nunca la solución.

- Añadir 10 ml de agua y mezclar entre 30-45 minutos
- Guardar en una campana de extracción de vapores
- Hacer una nueva solución cada 3 meses

6.4.1.4. Aislamiento de lipoproteínas

La fracción de quilomicrones se aislará a partir de 4 mL de plasma, obtenido a partir de tubos con EDTA, al que se le añadirá 200 µL de solución conservante. El plasma se depositará en tubos de centrifuga polyallomer 13,4 ml (REF 326826, Beckman Instr., Palo Alto, CA) y formando gradiente se añadirá 3.5 mL de una solución NaCl (0,15 mol/L) y EDTA (1mmol/L), (pH 7.4, $d < 1,006 \text{ kg / L}$), en un rotor tipo TY 70.1 (Beckman Instruments, Palo Alto, CA) a 30.000 rpm y 4 ° C, durante 30 min. La fracción superior será retirada por aspiración y almacenada a -80 ° C hasta el momento de ser utilizada para el análisis del retinil palmitato, determinaciones bioquímicas, apoB-48 y apoB-100. El infranadante se centrifugará formando gradiente con una solución de densidad 1.019 kg/L. La ultracentrifugación se realizará durante 22 h a 45000 rpm y 4°C en el mismo rotor. La fracción de remanentes de quilomicrones se recogerá de la capa superior por aspiración, y se almacenará a -80 ° C, hasta el momento de analizarse el retinil palmitato, determinaciones bioquímicas,

apoB-48 y apoB-100. Todo este proceso se realizará en luz tenue, para evitar la degradación de retinil palmitato

6.4.1.5. Aislamiento de células mononucleares.

Las células mononucleares se aislarán mediante un gradiente de Ficoll.

- 1.- Centrifugar la sangre a 2500 rpm, 10 min, 20°C (Para eliminar plaquetas centrifugar a 3000 rpm, 10 min, 4°C)
- 2.- Diluir a la mitad con PBS (añadir un volumen igual de PBS)
- 3.- Superponer en capa el doble volumen de Ficoll.
- 4.- Centrifugar a 2500 rpm sin freno, 20 min, 4°C.
- 5.- Recoger la capa intermedia de células y resuspender en 10 mL de PBS
- 6.- Centrifugar a 1800 rpm, 8 min, 4°C
- 7.- Eliminar el sobrenante y resuspender en 4 mL de PBS. Repartir 2ml en cada uno de los dos criotubos.
- 8.- Centrifugar a 1800 rpm, 8 min, 4°C.
- 9.- Eliminar el sobrenadante
10. Resuspender un criotubo con 400 µL de Buffer A y el otro en seco con nitrógeno. Almacenar ambos a -80 °C.

Buffer A:

10 mL HEPES

15 mM KCL

2 mM MgCL₂

1 mM EDTA

6.4.1.6. Cuantificación de retinil palmitato

El retinil palmitato (RP) contenido en las fracciones lipoproteicas será cuantificado según el método descrito previamente (J Lipid Res. 33:1541-1549). Los diferentes volúmenes de cada fracción (100 μ l de quilomicrones y 100-500 μ l de remanentes de quilomicrones) se ponen en tubos de cristal de 13 X 100 mm y se ajustan a un volumen total de 500 μ l con una solución isotónica de cloruro sódico. A cada tubo se añadirá retinil acetato (40 ng in 200 μ l of mobile phase buffer), que se utiliza como estándar interno. A continuación se añade 500 μ l de metanol y 500 μ l de buffer de base móvil hasta un volumen total de 1.7 ml. El buffer de fase móvil se preparará cada día y esta compuesto por 90 ml de hexano, 15 ml n-butyl chloride, 5 ml acetonitrilo, y 0.01 ml ácido acético (82:13:5 por volumen con 0.01 ml ácido acético). El contenido de los tubos se mezcla bien en cada paso. La mezcla final se centrifugará a 350 g durante 15 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se recoge con cuidado por aspiración y se transfiere a los viales del autoanalizador (1.1 ml capacidad). El autoinector se programará para un volumen de 100 μ l por inyección y recogida de la nueva muestra cada 10 min. Se utilizarán columnas de sílice SupelcoSil LC-SI (5mm, 25 cm X 4.6 mm inner diameter) suministrado por Supelco Inc (Bellefonte, PA). El flujo se mantendrá constante a 2 ml/min y el pico será detectado a 330 nm. El pido del Rp y del retinil acetato (RA) se identificará comparando el tiempo de retención con un estándar purificado (Sigma, St Louis, MO, USA). La concentración de RP en cada muestra se expresará como el ratio ABC del pico del RP/ABC del pico del RA. Todo el proceso se realizó protegiendo a la muestras de la luz.

6.4.1.7. Determinación de apo B-48.

La cuantificación de apo B-48 se realizará mediante ELISA con el kit comercial AKH48-Human Apo B48 (Europe-Gentaur Molecular Products, France)

6.4.1.8. Análisis lipídico

La glucosa, insulina, colesterol, triglicéridos HDL-C, LDL-C, apo AI, apo B, urea, ácido úrico, hemograma, hemoglobina glicosilada, CPK, GOT, PCR, sodio, potasio se determinarán en el laboratorio de bioquímica del Hospital Reina Sofía.

El colesterol y triglicéridos de las fracciones lipoproteicas se determinarán mediante test colorimétrico enzimático. El plasma para estos análisis precederá de tubos con EDTA. La apo A-I y apo B se determinarán por Immunoturbidimetría en plasma obtenido a partir de tubos que contienen EDTA. El HDL-C se determinará de forma directa mediante detergente acelerador específico (Abbott Diagnostic). El Colesterol LDL (LDL-C) se obtendrá mediante la fórmula de Friedewald (Clin Chem 1972; 18: 499-502). Las diferentes lipoproteínas plasmáticas (VLDL, LDL, HDL) se aislarán por ultracentrifugación en gradiente de densidad en un rotor Beckman tipo Ty 70.1 (45.000 rpm, 4 oC, 22 horas). Todos los estudios se realizarán mediante un analizador químico clínico automatizado, ARCHITEC c16000 (Abbott Diagnostic). Se utilizará el control de calidad interno, CLINIQA Liquid QC Unassayed General Chemistry (Vitro S.A).

La medición de la proteína C reactiva se realizará, en muestras procedentes de tubos conteniendo EDTA, por la técnica PCR Ultrasensible mediante una prueba inmunoturbidimétrica en un autoanalizador ARCHITEC c16000 (Abbott Diagnostic)

Las concentraciones plasmáticas de insulina se determinará, en tubos con EDTA, por estudio quimioluminiscente con micropartículas utilizando un ARCHITEC i2000SR (Abbott Diagnostic). Las concentraciones de glucosa se determinarán en tubos con EDTA mediante la técnica de la hexoquinasa/G-6-PDH

Las concentraciones plasmáticas postprandiales de ácidos grasos libres se determinarán los tiempos 0, 2 y 4 tras la ingesta aguda de grasa. Se determinará por estudio colorimétrico enzimático mediante un kit comercial, Free fatty acids, Half-micro test (Roche Diagnostic GmbH)

Además, se determinará la composición en ácidos grasos de los ésteres de colesterol de las LDL aisladas tras el periodo de intervención dietética

6.4.2 Protocolo de la biopsia de tejido graso (tiempos 0, 2 y 4???)

Este método generará tejido para dos alícuotas analíticas - una para la proteína y la otra para la extracción del RNA. Las muestras se deben procesar como se describen a continuación.

Material necesario:

- Anestésico local
- Bisturi
- Jeringuilla para la biopsia de hígado
- Aguja 146 x 3 1/5" (2.10 x 80m m)
- Equipo estándar para las biopsias transdermal (solución para el lavado de manos, los guantes estériles, gasas y aposito)
- Tubos estériles (~10ml) con suero fisiológico de ~3ml.
- Varios paños estériles empapados con suero fisiológico.
- Nitrógeno líquido
- Criotubo estéril etiquetado con 500 microL de RNA later
- Criotubo esteril etiquetado vacio

Método

1. Esterilizar la zona donde se realizará la incisión. Inyectar 20 ml de anestésico local de forma intracutánea. Esto molesta un poco. El resto del procedimiento es sin dolor.
2. Esperar 5 min. y esterilizar de nuevo la zona de intervención.
3. Hacer una incisión transdermal de 2-3 milímetros con el bisturí en la zona de la anestesia cutánea. No quedará ninguna cicatriz visible.
4. Adapte una aguja a la jeringuilla y empuje el pistón al fondo de la jeringuilla. Deje entrar ~ 1/3 de la aguja en la grasa subcutánea. Mover hacia atrás el pistón máximo hasta que sea sujetado por el tapón en el Hepafix. Se hará el vacío. Con una mano realizar una presión constante en la zona para crear resistencia del tejido fino. Con la otra mano mueva lentamente la jeringuilla hacía dentro y hacia fuera. Se aspirará ~1 ml = grasa 1g. Después de 2 minutos se pierde el vacío, por esto si se requiere más tejido graso se deberá repetir el procedimiento de nuevo.
5. Retirar el dispositivo de la biopsia del paciente. La jeringuilla se separa de la aguja.
6. Poner rápidamente una porción del tejido en un criotubo estéril y congelar en nitrógeno líquido y otra porción en un criotubo conteniendo 1 mL de RNA later.
7. Almacenar la muestra a -80°C si es en nitrógeno líquido, y a -20°C si es en RNA later.
8. Intentar extraer sangre del área de la biopsia. Presionar la zona durante unos minutos y ponga un apósito protegiendo la pequeña incisión
9. Informar al paciente de que no debe realizar una actividad física excesiva. Tras 3-4 semanas habrá desaparecido la señal de la biopsia.

6.4.3 Protocolo del estudio de la función endotelial

Se analizarán las variaciones en el flujo capilar de la piel mediante fluometría láser doppler, en los tiempos 0, 1, 2 y 4 h. Este método no invasivo de estudio de la función endotelial in vivo mide la vasodilatación que se produce en la microcirculación de la piel tras la isquemia. Debido a que esta es bloqueada por un inhibidor de la síntesis de óxido nítrico es considerada como dependiente del endotelio. Para ello se utilizará un equipo de fluometría láser doppler Periflux 5000 (Perimed France SARL). Las mediciones se realizarán en una habitación tranquila y con temperatura ambiente controlada entre 20 y 24°C, después de 30 minutos para la aclimatación del enfermo. Éste permanecerá en posición supina y con la mano no dominante elevada hasta la altura del corazón. Se colocará la pinza sonda en la segunda falange del tercer dedo. Todos los enfermos se estudiarán a la misma hora del día y las mediciones se realizarán por dos observadores independientes. Tras el reposo se procederá a la medición basal del flujo capilar. Posteriormente se someterá el brazo a isquemia mediante la compresión neumática con un esfigmomanómetro durante cuatro minutos a una presión siempre superior a 250 mmHg. Después se desinfla y, tras 30 segundos, se procede a una nueva medición, evaluando de este modo la vasodilatación mediada por el endotelio. Posteriormente tras otro periodo de reposo no inferior a 10 minutos y manteniendo el enfermo la misma posición, se vuelve a medir el flujo capilar antes y después de 3 minutos de la administración de nitroglicerina (Solinitrina) en forma de aerosol sublingual (1puff=0.4 mg), evaluando así la vasodilatación no mediada por el endotelio.

6.4.4. Estudio de las micropartículas endoteliales (EMP)

Las muestras para las EMP se recogerán a las 0, 2 y 4 h. Las EMP son medidas en plasma pobre en plaquetas, para ello se centrifuga la sangre en

tubos con anticoagulante durante 20 minutos a 3500 RPM. Se extrae el plasma y se congela a -80°C hasta su utilización.

Protocolo de EMP apoptóticas:

1. Se utilizan 100µl de plasma para el control negativo de la técnica y otros 100µl para el marcaje de las EMP.
2. Añadir al tubo positivo el anticuerpo CD31 en FITC para marcar las EMP endoteliales y su control isotipo al tubo negativo.
3. Incubar 20 minutos en oscuridad.
4. Añadir 2ml de PBS, se centrifuga a 1500 RPM, 5 minutos y se decantan los tubos.
5. Añadir 195µl de buffer Anexina V a los dos tubos y 5µl de Anexina V al tubo positivo.
6. Incubar 15 minutos en oscuridad.
7. Añadir 2ml de PBS, centrifugar a 1500 RPM, 5 minutos y decantar los tubos.
8. Añadir 500µl de cell-fix y 100 µl de Flow-Count a los dos tubos.
9. Adquirir las muestras en el citómetro FC-500 de Beckman Coulter.

Protocolo de EMP de activación:

1. Se utilizan 100µl de plasma para el control negativo de la técnica y otros 100µl para el marcaje de las EMP.
2. Añadir al tubo positivo los anticuerpos CD144 en PE y CD62 en FITC y sus controles isótopos al tubo negativo.
3. Incubar 20 minutos en oscuridad.
4. Añadir 2ml de PBS, centrifugar a 1500 RPM, 5 minutos y decantar los tubos.

5. Añadir 500µl de cell-fix y 100 µl de Flow-Count a los dos tubos.
6. Adquirir las muestras en el citómetro FC-500 de Beckman Coulter.

CÉLULAS PRECURSORAS DEL ENDOTELIO (VEGFR2+/CD133+/CD34+)

1. Se realizarán extracciones sanguíneas, en tubos con anticoagulante, a las 0, 2 y 4 h tras la sobrecarga grasa.
2. Coger 100µl de sangre para el tubo control negativo de la técnica y 100µl para el marcaje positivo.
3. Añadir los anticuerpos VEGFR2 en FITC, CD133 en PE y CD34 en TC en el tubo positivo y sus correspondientes antiisotipos en el negativo.
4. Incubar 20 minutos en oscuridad.
5. Añadir 2 ml de Facs Lysing e incubar 10 minutos.
6. Centrifugar a 1500 RPM, 5 minutos y decantar los tubos.
7. Añadir 2 ml de PBS y repetir el paso 6.
8. Añadir 500µl de Cell-Fix.
9. Adquirir las muestras en el citómetro FC-500 de Beckman Coulter.

6.4.5. Estudio del Grosor íntima-media

Se define como la distancia existente entre la interfase luz carotídea-íntima y la interfase media-adventicia de la pared posterior. Se toman 3 medidas a intervalos regulares, 1 cm pre-bifurcación. El resultado será la media de las 3 determinaciones de cada lado (carótida derecha y carótida izquierda). Se obtendrán imágenes ampliadas, sencillas, en escalas de grises de la arteria carótida a dos niveles a izquierda y a derecha. Los segmentos de los que se tomarán las imágenes son la arteria carótida común distal y el bulbo carotídeo

(siempre que sea posible). Las imágenes se obtendrán con la sonda mantenida a un ángulo de 45° estandarizado en cada nivel y con la cabeza del paciente girada a 45° de distancia desde el lado de estudio.

6.4.6. Ecocardiografía

Se aplica un gel conductor en el tórax del paciente y se coloca el transductor directamente sobre el tórax, por lo cual puede que se sienta presión en el área. El transductor es un instrumento que transmite ondas sonoras de alta frecuencia, el cual se va deslizando por las costillas cerca del esternón, dirigido hacia el corazón. Es posible que el médico que la realiza solicite al paciente que respire de cierto modo o que se incline hacia una posición concreta que permita visualizar mejor el corazón.

Todo este dispositivo anterior recoge los ecos de las ondas y los transmite como impulsos eléctricos. La máquina de ecocardiografía convierte estos impulsos en imágenes en movimiento del corazón.

Cuando las imágenes obtenidas no son claras de la forma anterior, o en determinadas indicaciones, se emplea el ecocardiograma transesofágico. Para este procedimiento se anestesia la parte posterior de la garganta y se inserta un endoscopio a través de ella. En la punta del endoscopio, hay un dispositivo ultrasónico que se guía hasta la parte inferior del esófago, que es el lugar en donde se suele obtener un ecocardiograma bidimensional del corazón más claro.

6.5. Protocolos para el análisis de parámetros inflamatorios y moléculas de adhesión.

En muestras de plasma recogidas en tubos de EDTA o citrato se medirán las concentraciones plasmáticas de IL6 y TNF- α por duplicado mediante kits de ELISA de R&D systems.

Las concentraciones plasmáticas postprandiales de leptina se determinarán por ELISA mediante un kit comercial, Leptin ELISA (DRG Instruments GmgH)

Los niveles plasmáticos postprandiales de adiponectina se determinarán por ELISA mediante un kit comercial, Human adiponectin/Acrp30 immunoassay (R&D Systems, Inc)

Los niveles plasmáticos postprandiales de resistina se determinarán por ELISA mediante un kit comercial, Human resistin ELISA kit (Linco research, Inc).

En muestras de plasma recogidas en tubos de EDTA, también, se medirán las concentraciones plasmáticas de ICAM-1, VCAM-1 y P-selectina por duplicado mediante los kits de ELISA de R&D systems.

Todos estos parámetros se medirán en los tiempos 0 y 4 h.

6.6. Protocolo para el análisis de parámetros de coagulación

Los niveles plasmáticos de PAI-1, tPA, vWF y β -tromboglobulina se determinarán por kit comerciales mediante ELISAs. El PAI-1 se determinará por el kit Chromolize PAI-1 (Accu Science), el tPA, vWF y kit β -tromboglobulina con los kit Asserachrom tPA ELISA, Asserachrom vWF ELISA (Diagnostica Stago) y Asserachrom vWF ELISA (Diagnostica Stago), respectivamente.

Los niveles de fibrinógeno se cuantificará, en muestras de plasma procedente de tubos con citrato, mediante un estudiode coagulación automatizado (Fibriquik, Organon Teknika Corporation) utilizando un Coag-A-Mate MTX (Organon Teknika Corporation), y comparando los tiempos de coagulación de las muestras con una dilución seriada de muestras de plasma con una concentración conocida de fibrinógeno.

Todos estos parámetros se medirán en los tiempos 0 y 4 h.

6.7. Condiciones de centrifugación:

Tubos	Análisis	Condiciones
Fluoride oxalate. Tubo gris	Glucosa	<ol style="list-style-type: none"> 1. 3000rpm, 10 min, 4°C 2. Alicuotar 3. Congelar a -20 °C
Suero. Tubo rojo	Insulina	<ol style="list-style-type: none"> 1. Reposar tubos 30 min a tª ambiente 2. 3000rpm, 10min, 4°C 3. Alicuotar y almacenar a -80°C
EDTA. Tubo violeta	Colesterol, TG, HDL-C, LDL-C, apo A1, apo B, PCR, Urea, Acido úrico, CPK, GOT, FA, sodio, potasio, Hemograma y AND. Células mononucleares	<ol style="list-style-type: none"> 1. 3000rpm, 10 min, 4°C 2. Retirar el plasma 3. Alicuotar muestras de plasma y congelar a -80°C 4. Recoger aproximadamente 1 ml de la capa blanquecina (capa leucocitaria) a un tubo, y almacenar a -80 °C 5.- Aislar células mononucleares y congelar en N2 y a -80°C.
Serum separator. Tubo rojo com separador	Leptina, resistina, adiponectina, IL-6, TNF-alfa, sICAM, sVCAM, P- selectina	<ol style="list-style-type: none"> 1. Reposar tubos 30 min a tª ambiente 2. 3000rpm, 10 min, 4°C 3. Alicuotar 4. Congelar a -80°C
Citrato sódico. Tubo azul	PAI-1, t-PA, fibrinogeno, vWF, beta- tromboglobulina	<ol style="list-style-type: none"> 1. Colocar los tubos en hielo antes de la recolección de la sangre. 2. 3000 rpm, 10 min, 4°C 3. Alicuotar 4. Pasar a nitrógeno líquido y congelar a -80 °C.
10 ml Orina		<ol style="list-style-type: none"> 1. Alicular y almacenar a -80°C .